

**ISOLASI DAN SCREENING BAKTERI ASAM LAKTAT DARI
FERMENTASI NANAS (*Ananas comosus* L.) SEBAGAI ANTIBAKTERI
Vibrio parahaemolyticus DAN *Staphylococcus aureus***

**ISOLATION AND SCREENING LACTIC ACID BACTERIA FROM
FERMENTED PINEAPPLE (*Ananas comosus* L.) AS ANTIBACTERIAL
AGAINST *Vibrio parahaemolyticus* AND *Staphylococcus aureus***

**Agustinus Candra^{*,1}, L. M. Ekawati Purwijantiningih¹, dan Ign. Pramana
Yuda¹**

*Penulis untuk korespondensi (agustinuscandraagus@gmail.com), ¹Fakultas
Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta
Jalan Babarsari no. 44, Yogyakarta 55281

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk melihat kemampuan Bakteri Asam Laktat (BAL) fermentasi buah nanas terhadap kemampuannya sebagai antibakteri *Vibrio parahaemolyticus* dan *Staphylococcus aureus* yang kemudian akan dilakukan *Screening* molekuler untuk melihat spesies BAL yang ditemukan. Fermentasi nanas dilakukan dengan metode fermentasi spontan selama 72 jam dengan suhu ruang. Isolasi BAL menggunakan medium MRS (*De Man Rogosa and Sharpe*) agar + CaCO₃ 1% menghasilkan 5 isolat BAL yang kemudian diuji karakterisasinya berupa pengecatan Gram, uji katalase, dan uji motilitas dimana semua isolat menunjukkan karakterisasi BAL pada umumnya yaitu berbentuk *bacillus* dan *rod*, hasil negatif pada uji katalase, dan non-motil pada uji motilitas. Uji zona hambat terhadap bakteri *V. parahaemolyticus* dan *S. aureus* menunjukkan hasil beda nyata dengan zona bening terhadap bakteri *S. aureus* sebesar 0,325 cm² dan terhadap bakteri *V. parahaemolyticus* sebesar 0,677 cm². Berdasarkan indentifikasi molekuler galur BAL menggunakan gen 16S rRNA yang dilakukan melalui PCR koloni dengan primer LABfw (5'-AGAGTTTGATYDTGGCTCAG-3') dan LABrv (5'-CACCGCTACACATGGAG-3') didapatkan kelima isolat BAL merupakan spesies *Lactobacillus plantarum* yang kemudian diberinama *Lactobacillus plantarum* strain AC1BIOUJY.

Kata kunci: Nanas, antibakteri, *Screening*, *V. parahemolyticus*, *S. aureus*.

Abstract

*This research aims to show the ability of Lactic Acid Bacteria (LAB) from fermented pineapple fruit as antibacterial ability against *Vibrio parahaemolyticus* and *Staphylococcus aureus* then will be screened molecular to know what species of LAB that are found. Fermented pineapple done with spontaneous fermentation method for 72 hours with room temperature. The isolation of lactic acid bacteria using MRS media (*De man Rogosa and sharpe*)+1% CaCO₃ then produce 5 isolates of LAB then happens tested his characteristic from catalase test, Gram staining and motility test where all isolates showed characterization of*

LAB generally valid bassil and shaped rods, negative results on test of catalase, and non-motile motility tests. Test zone drag against the bacterium *V. parahaemolyticus* and *S. aureus* shows different results with clear zones against the bacteria *S. aureus* of 0.325 cm² and *V. parahaemolyticus* bacteria against of 0.677 cm². Based on molecular identify strains of *LAB* using 16S rRNA genes made through PCR colonies with *LAB*fw primer (5' -AGAGTTTGATYDTGGCTCAG-3') and *LAB*rv (5' -CACCGCTACAC ATGGAG-3') obtained five isolates of *LAB* is *Lactobacillus plantarum* species which then took place was named *Lactobacillus plantarum* strain AC1BIOUAIJY.

Keyword: Pineapple, Antibacterial, Screening, *V. parahaemolyticus*, *S. aureus*

PENDAHULUAN

Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan bakteri yang sering digunakan di dalam industri pangan dalam membentuk pangan fungsional dan juga menghambat pertumbuhan varietas bakteri pembusuk dan patogen sehingga dapat digunakan sebagai antibakteri. Bakteri asam laktat dapat diperoleh dari hasil fermentasi buah-buahan yang mengandung glukosa untuk pertumbuhannya. Buah nanas mempunyai kandungan gula sebesar 12% yang merupakan jumlah yang baik dalam proses fermentasi (Muljohardjo, 1984).

Eksopolisakarida (EPS) berguna dalam bidang pangan dan farmasi seperti *dietary supplement* dan inulin, selain itu EPS hasil produksi BAL dapat menempel pada mukosa usus halus sehingga meningkatkan kemampuan untuk menekan pertumbuhan bakteri patogen (Madieto dan Gavilan, 2005). BAL-EPS yang berasal dari sawi asin diketahui memiliki kemampuan antibakteri terhadap *Vibrio parahaemolyticus* (Gram negatif) dan *Staphylococcus aureus* (Gram positif) karena adanya mekanisme antimikroba yang disebabkan oleh asam organik yang dihasilkan isolat BAL (Halim dan Zubaidah, 2013). Oleh sebab itu BAL EPS yang diisolasi dari fermentasi nanas diduga dapat menghambat pertumbuhan *V. parahaemolyticus* dan *S. aureus* di *seafood* yang banyak digemari masyarakat.

Kedua bakteri tersebut dapat menyebabkan infeksi gastrointestinal yang ditandai dengan muntah-muntah, diare dan rusaknya pembuluh darah (Madigan dkk., 2012).

Selain mengetahui potensi antibakteri dari BAL-EPS, identifikasi spesifik terhadap jenis BAL-EPS penting dilakukan karena Indonesia berpotensi untuk menghasilkan mikroorganisme yang belum banyak diteliti dan teridentifikasi serta terdaftar pada jenis BAL yang ada. BAL-EPS kemudian dapat digunakan sebagai acuan dalam skrining molekuler dan menggunakan gen 16S rRNA untuk menentukan identitas dari gen yang didapat. Hasil yang didapatkan kemudian dicocokkan dengan NCBI (Malik dkk., 2010).

METODE PERCOBAAN

Fermentasi buah nanas: Nanas dicuci bersih dan dipotong dengan ukuran 4x4 cm sama rata. Nanas ditimbang sebanyak 500 gram dan dimasukkan ke dalam toples, kemudian ditambahkan garam 2% (b/b nanas) dan glukosa teknis 0,5% (b/b nanas). Air masak dimasukkan hingga permukaan nanas terendam. Toples ditutup dan difermentasi pada suhu ruang selama 3-4 hari (Rustan, 2013).

Pengukuran pH fermentasi nanas: Larutan dari fermentasi nanas diambil sebanyak 10 ml dan diukur menggunakan pH meter. Perlakuan dilakukan sebanyak tiga (3) kali pengulangan dengan melihat angka yang ditunjukkan oleh pH meter (Sudarmadji, 1997 dengan modifikasi).

Pengukuran nilai total asam laktat: Larutan sampel fermentasi nanas diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Sampel ditambah dengan

indikator PP (*Phenolphthalin*) sebanyak 1 tetes. Larutan sampel dititrasi dengan NaOH 0,1 N hingga berwarna pink (Sudarmadji, 1997 dengan modifikasi).

Isolasi dan purifikasi bakteri asam laktat (BAL): Sampel sebanyak 10 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebagai pengenceran 10^0 dan diencerkan hingga pengenceran 10^{-5} dengan memasukkan 1 ml sampel ke dalam 99 ml pengencer. Metode inokulasi yang digunakan yaitu metode *streak plate* menggunakan medium MRS (*De Man Rogosa and Sharpe*) agar yang ditambah dengan 1% kalsium karbonat. Sampel diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C . Hasil positif teridentifikasi BAL adalah adanya zona bening di sekitar koloni bakteri tunggal. Kultur dimurnikan kembali pada MRS agar dengan menggunakan metode *streak plate* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Kultur yang sudah murni disimpan pada MRS agar miring dengan suhu $4-10^{\circ}\text{C}$ (Rustan, 2013 dengan modifikasi).

Pengecatan Gram: Gelas benda dibersihkan dengan alkohol 70%. Biakan BAL diambil 1 ose (secara aseptis) lalu dioleskan di atas gelas benda dan difiksasi. Gelas benda ditetesi cat Gram A (kristas violet), didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas dengan akuades, dan dikeringkan, ditetesi cat Gram B (iodine), didiamkan selama 1 menit, dibilas, dan dikeringkan, ditetesi cat Gram C, didiamkan selama 10 detik, dibilas, dan dikeringkan, dan terakhir ditetesi cat Gram D, didiamkan selama 10 detik, dibilas, dan dikeringkan. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop perbesaran 1000x. Hasil pengamatan positif jika didapatkan sel bakteri berwarna ungu (Sacher dan MchPherson, 2002).

Uji katalase bakteri: Satu tetes larutan 3% H_2O_2 ditetaskan di atas bakteri asam laktat. Katalase positif ditandai dengan terbentuknya gelembung udara. Reaksi katalase negatif apabila saat ditetaskan pada sel bakteri namun tidak menunjukkan adanya busa atau buih setelah 1 menit (Hardiningsih dkk., 2006).

Uji motilitas bakteri: Isolasi bakteri asam laktat diambil secara aseptis dengan jarum enten, kemudian isolat bakteri dimasukkan ke dalam MRS agar lunak tegak. Inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Isolat non motil hanya tumbuh pada sekitar tusukan inokulasi sedangkan isolat motil akan tumbuh menyebar (Rahayu dan Margino, 1997 *diacu dalam* Lindayani dan Hartayanie, 2012).

Uji zona hambat: Bakteri yang terdapat pada medium *Nutrient Agar* (NA) di petridish dilubangi dengan perforator nomor 4 (diameter 6 mm) sebanyak 4 lubang pada daerah yang berbeda dan berjauhan. Isolat Bakteri Asam Laktat yang ditumbuhkan pada MRSB (*De Man Rogosa and Sharpe Broth*) dimasukkan di tiap lubang yang berbeda sebanyak 70 mikroliter. Agar tersebut kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 48 jam pada suhu 37°C . Perubahan dan zona hambat yang terbentuk diamati (Abel dkk., 2014 dengan modifikasi).

Identifikasi molekuler galur BAL: Identifikasi molekuler untuk mengetahui galur BAL dilakukan dengan cara *Polymerase Chain Reaction* (PCR) koloni dengan menggunakan KAPA Taq Extra HotStart ReadyMix PCR Kit. Komposisi untuk campuran PCR dengan total reaksi 10 μL yaitu 5 μL PCR kit, 0,5 μL masing-masing pasangan primer 10 μM , 1 koloni tunggal BAL dan diresuspensi dengan ddH₂O hingga total volume reaksi 10 μL . Biakan koloni tunggal BAL berumur 48 jam diambil menggunakan tusuk gigi steril sebanyak 1 koloni dengan

ukuran ± 1 mm (Azhahianambi dkk., 2008). Primer yang digunakan adalah LABFw dan LABRv dengan sekuen sebagai berikut:

Tabel 1. Primer Oligonukleotida yang digunakan untuk Identifikasi Molekuler Galur dengan Gen 16S rRNA

Nama	Sekuens
LABFw	5' -AGAGTTTGATYDTGGCTCAG- 3'
LABRv	5' -CACCGCTACACATGGAG- 3'

(Sumber: Malik dkk., 2010).

Tabel 2. Suhu Pengaturan PCR Identifikasi Molekuler Galur dengan Gen 16S rRNA

Tahap		Suhu	Durasi
Predenaturasi		95 °C	5 menit
Cycle (35x)	Denaturasi	95 °C	30 detik
	Annealing	42 °C	45 detik
	Extension	72 °C	60 detik
Final Extension		72 °C	2 menit
Hold		4 °C	

(Sumber: Malik dkk., 2008)

Visualisasi hasil *Polymerase Chain Reaction* (PCR) galur BAL: Visualisasi dilakukan dengan metode elektroforesis dengan menggunakan agarosa 1,4% dengan tegangan 100v selama 20 menit. Identifikasi molekuler dilakukan dengan gen 16S rRNA dengan primer LABFw dan LABRv. Hasil positif yang diduga galur BAL pembawa gen *gtf* adalah menghasilkan amplikon dengan ukuran kurang lebih 700pb (Malik dkk., 2010).

Service sequencing DNA: *Sequencing* DNA dilakukan dengan cara mengirimkan sampel hasil *Polymerase Chain Reaction* ke laboratorium 1st BASE Sequencing INT, Malaysia.

Accession number nukleotida dengan NCBI: Sekuens nukelotida yang diperoleh dalam penelitian ini telah teresedia di databas GenBank dengan *accession number* GU49402-GU049414 dan GU056835. Upload dilakukan dengan mengakses situs web GenBank

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/submit/>) dan selanjutnya di *submit via* bankit (Malik dkk., 2010).

Analisis Data: Data hasil penelitian yang diperoleh akan dianalisis dengan menggunakan ANAVA untuk mengetahui ada tidaknya beda nyata antar perlakuan. Jika ada hasil beda nyata akan dilanjutkan menggunakan uji DMRT dengan tingkat kepercayaan 95% dengan software SPSS versi 15.0 (Gasperz, 1991).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rata-rata pH yang didapatkan dari fermentasi pada hari ke-0 yaitu sebesar 3,93; sedangkan pada hari ke-1 terjadi penurunan rata-rata tingkat keasaman menjadi 3,83. Hasil ini menunjukkan bahwa pH tertinggi sebesar 3,93 pada hari ke-0 atau saat mulai fermentasi dan pH terendah sebesar 3,17 pada hari ke-3 atau saat fermentasi berakhir. Derajat keasaman (pH) yang dihasilkan dalam fermentasi ini cocok bagi aktivitas Bakteri Asam Laktat (BAL). Menurut Djaafar dkk. (1996), derajat keasaman (pH) yang optimum bagi aktivitas BAL berkisar antara pH 3 – 8. Perubahan nilai pH dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil perhitungan pH dan total asam tertitrasi (TAT) fermentasi buah nanas

Hari ke-	Volume Titran	Total Asam Laktat	Rata-Rata pH
0	0,1 ml	0,9 %	3,93
1	0,3 ml	2,7 %	3,83
2	1,2 ml	10,8 %	3,35
3	1,5 ml	13,5 %	3,17

Penurunan nilai pH larutan menjadi lebih asam karena adanya proses fermentasi yang menghasilkan asam laktat yang mengubah bahan organik pada sayuran atau buah-buahan menjadi asam. Penurunan pH juga disebabkan oleh

pecahnya senyawa kompleks NaCl menjadi ion Na^+ dan Cl^- . Ion Na^+ dibutuhkan oleh BAL sebagai substitusi ion-ion K^+ ketika terjadi difusi, sedangkan ion-ion Cl^- berikatan menyebabkan dengan air bebas bahan yang menyebabkan ketersediaan air dalam bahan berkurang dan menyebabkan suasana lingkungan menjadi menjadi asam karena terbentuknya senyawa HCl (Desniar dkk., 2009).

Hasil TAT juga mengalami perubahan yang dapat dilihat pada Tabel 3. Hasil pada hari ke 0 sebesar 0,9%, sedangkan pada hari ke-1 sebesar 2,7%, dan pada hari ke-2 mengalami peningkatan lagi dengan hasil sebesar 10,8%. Pada hari ke-3, hasil TAT yang didapatkan yaitu sebesar 13,5%. Nilai total asam laktat terendah yang didapatkan yaitu sebesar 0,9% pada hari ke-0 dan total asam tertinggi sebesar 13,5% pada hari ke-3. Peningkatan total asam laktat hal ini disebabkan karena aktivitas BAL yang terbentuk, dimana selama proses fermentasi berlangsung, BAL akan menghasilkan sejumlah asam-asam organik seperti asam laktat, asam asetat, asam formiat, diasetil, dan hidrogen peroksida yang mempengaruhi tingkat keasaman larutan (Jenie dkk., 2001). Selain itu BAL dapat mengkonversi gula menjadi asam organik (laktat dan asetat) yang akan disekresikan keluar sel sehingga menyebabkan penurunan pH dan mendegradasi karbohidrat untuk digunakan sebagai sumber nutrisi bagi mikroorganisme pengganggu atau pembusuk (Rahayu dkk., 1995).

Metode isolasi dan purifikasi bakteri asam laktat (BAL) yang digunakan adalah *streak plate* yang bertujuan untuk mendapatkan koloni tunggal yang diduga BAL. Medium yang digunakan adalah medium MRS (*De Man Rogosa and Sharpe*) agar + CaCO_3 1% dimana medium ini merupakan medium selektif dalam

menumbuhkan BAL, sedangkan penambahan CaCO_3 berguna menjadi penanda pertumbuhan BAL. Bakteri asam laktat akan mengikat CaCO_3 menjadi Ca-laktat yang larut, sehingga menimbulkan zona bening yang menunjukkan ciri BAL seperti yang ditunjukkan lingkaran merah pada Gambar 1 (Nudyanto dan Zubaidah, 2015).



Gambar 1. Zona bening pada bakteri asam laktat

Sebanyak 10 koloni tunggal yang diduga BAL dengan ciri-ciri yang sama (AB 1 – AB 10) diambil dan dimurnikan lagi di media MRSA + CaCO_3 1% dengan tujuan mendapatkan biakan koloni BAL yang pasti. Sebanyak 5 koloni tunggal hasil pemurnian diambil lagi dan diperbanyak di medium MRSA miring sebagai biakan murni yang akan digunakan sebagai antibakteri *Staphylococcus aureus* dan *Vibrio parahaemolyticus* dengan karakteristik makroskopik karakterisasi BAL, yaitu warna putih susu, bulat, berukuran kecil, tepi entire, permukaan halus mengkilap, elevasi cembung, dan tepian jelas terdapat zona bening.

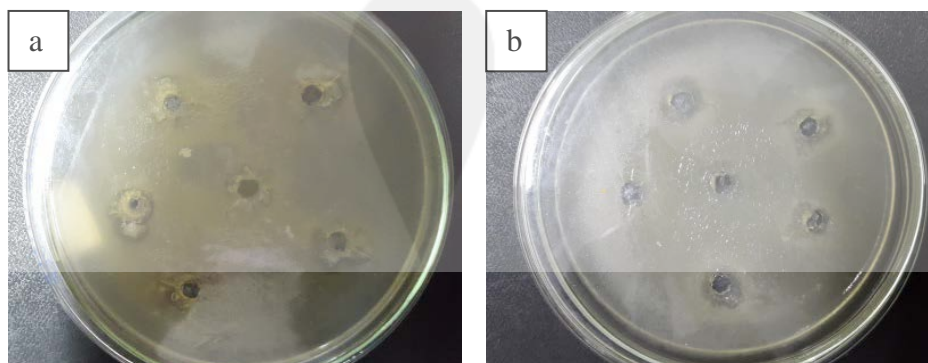
Hasil karakterisasi BAL berupa pengecatan Gram, uji katalase, dan uji motilitas pada kelima isolat BAL yang ditemukan menunjukkan hasil positif karakterisasi bakteri asam laktat yang ditunjukkan pada Tabel 4:

Tabel 4. Hasil karakterisasi isolat bakteri asam laktat

Isolat BAL	Pengecatan Gram	Uji Katalase	Uji Motilitas
AB 1	<i>Bassil</i>	-	Non-motil
AB 2	<i>Bassil</i>	-	Non-motil
AB 3	<i>Rod</i>	-	Non-motil
AB 4	<i>Rod</i>	-	Non-motil
AB 5	<i>Rod</i>	-	Non-motil

Uji zona hambat Bakteri Asam Laktat (BAL) terhadap bakteri *S. aureus* dan *V. parahaemolyticus* dilakukan dengan menggunakan metode difusi. Menurut Cadirici dan Citak dalam Rachmawati dkk.(2005), mengatakan bahwa kelebihan metode ini adalah seluruh metabolit yang dihasilkan BAL dapat diproduksi selama uji antimikrobia. Hal ini dapat memberikan hasil yang lebih efektif dibandingkan metode lain.

Rata-rata zona bening yang dihasilkan dari 5 isolat BAL pada 3 kali pengulangan terhadap bakteri *S. aureus* sebesar 0,325 cm². Rata-rata zona bening yang terbentuk pada bakteri *V. parahaemolyticus* yaitu sebesar 0,677 cm². Berdasarkan analisis ANAVA, terdapat beda nyata zona hambat yang terbentuk, dimana zona hambat lebih besar terbentuk pada bakteri *V. parahaemolyticus* yang merupakan Gram Negatif daripada bakteri *S. aureus* yang merupakan Gram Positif.



Gambar 2. Hasil zona hambat bakteri *Vibrio parahaemolyticus* (a) dan *Staphylococcus aureus* (b)

Hasil pengujian aktivitas antimikrobia terhadap bakteri *S. aureus* dan *V. parahaemolyticus* dapat dilihat pada Tabel 4:

Tabel 5. Luas zona hambat BAL terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Vibrio parahaemolyticus* (cm²)

Antibakteri	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Rata-rata
AB 1	0,283	0,35	0,317 ^x
AB 2	1,417	0,213	0,815 ^x
AB 3	0,383	0,283	0,333 ^x
AB 4	0,67	0,51	0,590 ^x
AB 5	0,63	0,27	0,450 ^x
Rata-Rata	0,677 ^a	0,325 ^b	

Ket : Angka yang diikuti huruf yang sama pada baris dan kolom yang sama menunjukkan hasil yang tidak beda nyata

Menurut Pan dkk. (2009), kategori zona hambat juga dapat diukur melalui besarnya diameter zona bening yang dihasilkan. Kategori pengukuran daya hambat yang dijelaskan, yaitu:

Tabel 6. Kategori pengukuran zona hambat

Diameter (mm)	Kategori
0-3 mm	Lemah
3-6 mm	Sedang
> 6 mm	Kuat

(Sumber: Pan dkk., 2009)

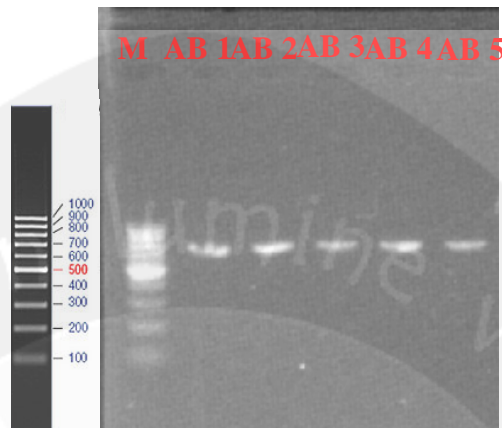
Berdasarkan kategori pengukuran zona hambat yang dijelaskan Pan dkk. (2009), daya penghambatan BAL terhadap bakteri *S. aureus* merupakan daya hambat yang lemah (8,3 mm – 6 mm = 2,3 mm) karena nilai 0-3 mm dikategorikan nilai daya hambat yang lemah. Daya penghambatan bakteri asam laktat terhadap bakteri *V. parahaemolyticus* dikategorikan mempunyai nilai daya hambat sedang (3-6 mm) dengan nilai sebesar 4,8 mm. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri asam laktat hasil fermentasi nanas mempunyai daya penghambatan lebih kuat terhadap bakteri Gram Negatif (*V. parahaemolyticus*).

Hasil beda nyata ini dikarenakan adanya beberapa faktor seperti perbedaan lapisan dinding, ketahanan terhadap asam, dan bakteriosin pada bakteri Gram Positif (*S. aureus*) dan bakteri Gram Negatif (*V. parahaemolyticus*). Menurut Radji (2011), bakteri Gram Negatif terdiri atas satu atau lebih peptidoglikan yang tipis dan substansinya tidak mengandung asam teikoat seperti bakteri Gram Positif yang dapat berfungsi sebagai antigen. Hal inilah yang menyebabkan bakteri Gram Positif lebih tahan terhadap penghambatan bakteri asam laktat. Pada Gram negatif, walaupun memiliki banyak lapisan yang lebih kompleks, namun lapisan tersebut hanya terdiri dari lapisan peptidoglikan yang tipis dan tidak mengandung asam teikoat sehingga rentan terhadap gangguan fisik seperti pemberian zat antibakteri dalam merusak dan mengganggu fungsi membran sel (Radji, 2011).

Daya penghambatan juga dipengaruhi dari bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL dan adanya produksi hidrogen peroksida (H_2O_2). Efek antibakteri dari H_2O_2 dapat menyebabkan denaturasi sejumlah enzim dapat meningkatkan permeabilitas membran sel yang menyebabkan zat antibakteri lebih mudah masuk ke dalam sel. Efek bakterisidal H_2O_2 dipengaruhi oleh efek oksidasi yang kuat pada sel bakteri dan kerusakan struktur molekul dasar dari sel protein (Pelzcar dan Chan, 2005).

Dalam indentifikasi molekuler galur BAL menggunakan gen 16S rRNA yang dilakukan melalui PCR koloni dengan primer LABfw (5'-AGAGTTTGATYDTGGCTCAG-3') dan LABrv (5'-CACCGCTACACATGGAG-3'). Menurut Rinanda (2011), gen pengkode RNA ribosomal (rRNA) digunakan untuk menentukan taksonomi, filogenei (hubungan evolusi) serta

memperkirakan jarak keragaman antar spesies (*rates of species divergence*) bakteri. Hasil elektroforesis yang didapatkan ditunjukkan pada Gambar3.



Gambar 3. Hasil PCR isolat bakteri asam laktat

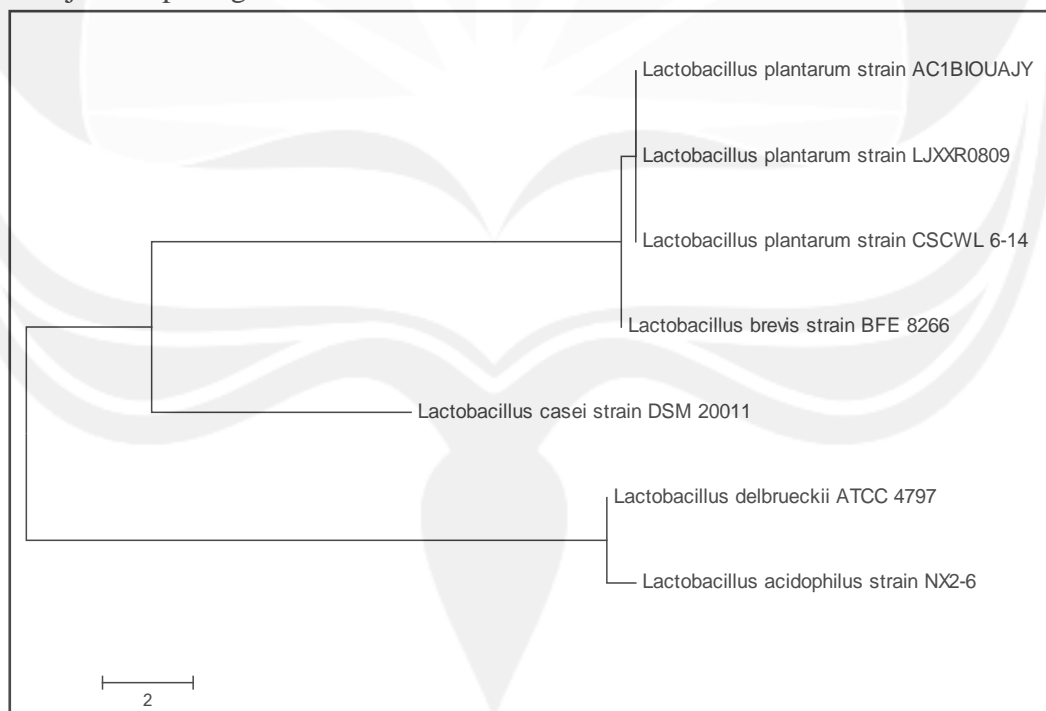
Dari kelima isolat BAL yang dilakukan reaksi PCR, didapatkan bahwa kelima isolat bakteri mempunyai hasil yang positif ketika dilakukan amplifikasi dengan PCR koloni dan mempunyai ukuran ampikon 750 bp. Hasil sementara sebelum dilakukan *sequencing* dapat dikatakan bahwa kelima isolat bakteri mempunyai galur BAL yang sama. Kelima isolat BAL ini kemudian dilakukan *sequencing* agar dapat mengetahui jenis galur pasti yang terdapat pada isolat BAL tersebut yang ditunjukkan pada Tabel 6.

Tabel 6. Galur-galur BAL dengan identitas berdasarkan Gen 16S rRNA

Nama Sampel	Homologi (% identitas)	Identitas	GenBank Accession number)
AB 1	99%	<i>Lactobacillus plantarum</i>	gi 325587127 HQ259243.1
AB 2	99%	<i>Lactobacillus plantarum</i>	gi 914597686 KT378454.1
AB 3	99%	<i>Lactobacillus plantarum</i>	gi 820885868 KR055061.1
AB 4	99%	<i>Lactobacillus plantarum</i>	gi 914597686 KT378454.1
AB 5	99%	<i>Lactobacillus plantarum</i>	gi 914597686 KT378454.1

Perbandingan sekuen gen 16S rRNA yang didapatkan berdasarkan pohon filogenetik menunjukkan bahwa isolat *Lactobacillus plantarum* strain AC1BIOUAIY yang ditemukan dari fermentasi nanas mempunyai kekerabatan dekat dengan *Lactobacillus plantarum* strain LJXXR0809, *Lactobacillus*

plantarum strain CSCWL 6-14 dan *Lactobacillus brevis* strain BFE 8266. Menurut Ludwig dan Klenk (2001), dua isolat yang berada pada cabang yang sama menandakan adanya kesamaan spesies. Isolat *L. plantarum* strain AC1BIOUJY tidak berada pada cabang (*node*) yang sama dengan bakteri *Lactobacillus casei* strain DSM 20011, *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 4797, dan *Lactobacillus acidophilus* strain NX2-6, namun memiliki *root* (nenek moyang) yang sama tetapi mengalami perubahan yang berbeda ketika berevolusi seperti fenotipe yang berbeda, ketahanan (resisten) terhadap antibakteri, dan kemampuan sebagai antibakteri. Desain pohon filogenetik dilakukan menggunakan program MEGA5 dengan metode *Neighbor-Joining Tree*. Hasil desain pohon filogenetik ditunjukkan pada gambar 4:



Gambar 4. Pohon filogenetik isolat bakteri asam laktat dengan dan strain referensi dari database 16S rRNA *Lactobacillus* sp. sebagai *outgroup*

SIMPULAN

1) Jenis bakteri asam laktat yang dapat mengurangi pertumbuhan bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dan *Staphylococcus aureus* adalah *Lactobacillus plantarum*. 2) Bakteri asam laktat dari fermentasi nanas dapat digunakan sebagai antibakteri dengan daya penghambatan lemah pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan daya penghambatan sedang pada bakteri *Vibrio parahaemolyticus*. 3) Luas zona hambat yang dihasilkan pada bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar 0,32 cm² dan pada bakteri *Vibrio parahaemolyticus* sebesar 0,68 cm².

SARAN

1) Perlu dilakukan penelitian lanjutan berupa aplikasi penggunaan bakteri asam laktat fermentasi nanas yang sudah ditemukan sebagai biopreservatif bahan pangan. 2) Pengukuran zona hambat sebaiknya dilakukan pada medium *Mueller-Hinton* untuk mendapatkan hasil zona hambat yang lebih baik. 3) Perlu adanya penggunaan sampel nanas yang bervariasi sehingga identitas bakteri asam laktat yang ditemukan lebih bervariasi dan juga penggunaan bakteri uji yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Abel, E. E., Poonga, P. R. J., dan Panicker, S. G. 2014. Effects of different solvent extracts of *Cassia tora* leaves against Gram positive bacteria. *International Journal of Pharmacy and Life Science* 5(4): 3436-3439.
- Azhahianambi P, Ghosh S, Kumar A, Suryanaraya VVS. 2008. Cost effectiveness of colony lysis and colony PCR methods for screening of recombinant *Escherichia coli* colonies—a comparative study. *Indian J. Exp. Biol.* 46(10):731-735.
- Desniar, Rusmana, I. Suwanto, A., dan Mubarik, N. R. 2012. Senyawa Antimikroba yang Dihasilkan oleh Bakteri Asam Laktat Asal Bekasam. *Jurnal Akuatika* 3(2): 135-145.
- Djaafar, T. F., Rahayu, E. S., Wibowo, D., dan Sudarmadji, S. 1996. Substansi Antimikrobia Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Makanan Hasil Fermentasi Tradisional Indonesia. *Jurnal Pert Indo* 6(1): 15-21.
- Gasperz, V. 1991. *Metode Perancangan Percobaan*. Armico, Bandung.

- Halim, C. N. Dan Zubaidah, E. 2013. Studi Kemampuan Probiotik Isolat Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida Tinggi Asal Sawi Asin (*Brassica juncea*). *Jurnal Pangan dan Agroindustri* 1(1): 129-137.
- Hardiningsih, R., Napitupulu, R. N. R., dan Yuinery, T. 2006. Isolasi dan Uji Resistensi Beberapa Isolat *Lactobacillus* pada pH Rendah. *Biodiversitas* 7(1): 15-17.
- Jenie, B. S. L., Nuratifa, dan Suliantari. 2001. Peningkatan Keamanan dan Mutu Simpan Pindang Ikan Kembung (*Rastrelliger sp.*) dengan Aplikasi Kombinasi Natrium Asetat, Bakteri Asam Laktat dan Pengemasan Vakum. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 12(1): 21-27.
- Madiedo, R. P. Dan Gavilan, L. R. 2005. Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. *Journal Dairy Sci* 88: 843-856.
- Madigan, M. T., Martinko J. M., dan Parker J. 2012. *Biology of Microorganisms, 13th edition*. Pearson Education, United States of America.
- Malik, A. Ajitya K. H. dan Mahardika H. 2010. Isolasi dan Skrining Molekuler Bakteri Asam Laktat Pembawa Gen Glukansukrase dari Makanan dan Minuman Mengandung Gula. *Makara Sains* 14(1): 63-68.
- Malik, Amalia, Donna M. Ariesranti, Anandayu Nurfachtiyanti, dan Arry Yanuar. 2008. Skrining Gen Glukonsiltransferase (*GTF*) Dari Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida. *Makara Sains* 12(1): 1-6.
- Muljohardjo, M. 1984. *Nanas dan Teknologi Pengolahannya (Ananas comosus L. Merr)*. Liberty, Yogyakarta.
- Nudyanto, A. dan Zubaidah, E. 2015. Isolasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Eksopolisakarida dari Kimchi. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* 3(2): 743-748.
- Pan, X., F. Chen, T. Wu, H. Tang dan Z. Zhao. 2009. The Acid, Bile Tolerance and Antimicrobial Property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *J. Food Control* 20: 598-602.
- Pelczar, M. J. dan Chan, E. C. S. 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. UI Press, Jakarta.
- Rachmawati, I., Suranto., dan Setyaningsih, R. 2005. Uji Antibakteri Asam Laktat asal Asinan Sawi Terhadap Bakteri Patogen. *Bioteknologi* 2(2): 43-48.
- Rahayu, E. S. dan Margino, S. 1997. Bakteri Asam Laktat: Isolasi dan Identifikasi. *Materi Workshop*. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Radji, M. 2011. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Rustan, I. R. 2013. Studi Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Fermentasi Cabai Rawit (*Capsicum fruetencens* L.). *Skripsi S-1*. Fakultas Pertanian Universitas Hasanuddin, Makasar.
- Sacher, R. A. Dan McPherson, R. A. 2002. *Tinjauan Klinis Hasil Pemeriksaan Laboratorium*. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Sudarmadji, S. 1997. *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Liberty, Yogyakarta.